

4. 佐藤 薫、グリア型グルタミン酸トランスポーター、日薬理誌 138:127, 2011

学会発表

国内学会

1. 李敏、黒川洵子、諫田泰成、関野祐子、古川哲史、Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. 第124回薬理学会関東部会(2011.6)
2. 藤森康希、高木淳平、佐藤 薫、鈴木岳之、炎症時のグリア間コミュニケーションがグルタミン酸トランスポーター機能変化をもたらす 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011 (2011.8)(東京)
3. 佐藤 薫、高木淳平、藤森康希、鈴木岳之、関野祐子、パロキセチンは新規メカニズムにより炎症下のグルタミン酸取り込み機能低下を抑制する 第34回 日本神経科学大会 (2011.9)(横浜)
4. 鈴木岳之、高木淳平、藤森康希、佐藤 薫、炎症時グリア間コミュニケーションによりアストロサイトグルタミン酸トランスポーター機能低下が引き起こされる 第34回 日本神経科学大会 (2011.9)(横浜)
5. 最上(重本)由香里、関野祐子、大野泰雄、佐藤 薫 生後ラットの脳・SVZ周辺において活性化ミクログリアは神経およびグリア細胞の新生・分化を制御している 第34回 日本神経科学大会 (2011.9)(横浜)
6. 片山(小口)敦子、門間彰彦、大友ゆき、守口 徹、関野祐子、佐藤 薫、胎生期および新生期バルプロ酸暴露によるラット扁桃体遺伝子発現変動の網羅的解析 第34回 日本神経科学大会 (2011.9)(横浜)
7. 高橋由香里、永瀬将志、落合敏平、安井 豊、中尾彩乃、渡部文子、高木 聡、佐藤 優、奥津 浩也、守口徹、佐藤 薫、加藤総夫 胎生～新生期における化学暴露が扁桃体神経興奮性に及ぼす影響の多面的評価法 第34回 日本神経科学大会 (2011.9)(横浜)
8. 中 誠則、真嶋悠幾、井手総一郎、佐藤 薫、南 雅文 新生期バルプロ酸暴露が成獣ラット情動行動に与える影響 第21回 日本臨床精神神経薬理学会・第41回日本神経精神薬理学会 合同年会(2011.9)(東京)
9. 真嶋悠幾、中 誠則、井手総一郎、佐藤 薫、南 雅文 新生期バルプロ酸暴露が成獣ラット情動行動に与える影響 第62回 日本薬理学会北部会(2011.9)(仙台)
10. Li M., Kurokawa J., Kanda Y., Toyama S., Murata M., Sekino Y., Fukuda K., Furukawa T. Quantitative characterization of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. The 1st HD physiology international symposium: Integrative multi-level systems biology for in silico cardiology and pharmacokinetics. (2012.1) (東京)
11. 佐藤 薫 iPS細胞由来ニューロンの薬理的プロファイリング 平成23年度厚生労働省科学研究費補助金医療品・医療機器等レギュラトリーサイ

- エンス総合研究事業シンポジウム「ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ」(2012.2)(東京)
12. 佐藤 薫、最上由香里、関野祐子 創薬標的としてのミクログリアの新しい可能性 日本薬学会第 132 回年会シンポジウム「次世代創薬に向けた新たな戦略」(2012.3)(札幌)
  13. 高橋華奈子、最上(重本)由香里、岡田洋平、大津香苗、福角勇人、正札幌子、金村米博、岡野栄之、関野祐子、佐藤 薫 ヒト iPS 由来神経細胞標本の薬効・毒性評価への応用可能性—最適 iPS 株探索と標準プロトコルの作成 日本薬学会第 132 回年会(2012.3)(札幌)
  14. 最上(重本)由香里、藤森康希、五十嵐良明、広瀬明彦、関野祐子、佐藤 薫 カーボンナノチューブが神経幹細胞に与える影響 日本薬学会第 132 回年会(2012.3)(札幌)
  15. 片山敦子、門馬彰彦、大友ゆき、今井美鈴、秋友孝文、守口 徹、関野祐子、佐藤 薫 胎生～新生期の化学物質暴露が情緒社会性におよぼす影響を予測するマーカー機能タンパク質遺伝子群の探索 日本薬学会第 132 回年会(2012.3)(札幌)
  16. 藤森康希、高木淳平、佐藤 薫、鈴木岳志 炎症条件下グルタミン酸トランスポーター機能低下に対する抗うつ薬の作用 第 85 回日本薬理学会年会(2012.3)(京都)
  17. 佐藤 薫、栗脇淳一、高橋華奈子、斉藤善郎、岡淳一郎、尾谷優子、沙宇、中澤憲一、関野祐子、大和田智彦 エストロゲン受容体を介さずグリア型グルタミン酸トランスポーターを抑制するタモキシフェン関連化合物の発見 第 85 回日本薬理学会年会(2012.3)(京都)
- 国際学会
1. Sato K., Shigemoto-Mogami Y., Ohno Y., Sekino Y. Microglia instruct neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal SVZ (ミクログリアは生後初期脳室下帯の神経新生、オリゴデンドロサイト新生を促進する) ISN-ESN-2011 23rd Biennial Meeting (2011.8-9) (Athens, Greece; アテネ市, ギリシャ国)
  2. Sato K., Shigemoto-Mogami Y., Ohno Y., Sekino Y. The role of activated microglia accumulated in the early postnatal SVZ (生後初期脳室下帯に集積しているミクログリアの役割) ISN Satellite meeting, Glial cells in (patho)physiology (2011.8)(Ljubljana, Slovenia; リュブリャナ市, スロベニア国)
  3. Sato K., Takaki J., Fujimori K., Suzuki T., Sekino Y. Down-regulation of astrocyte L-glu transporters under inflammation is caused by glia-glia communication (炎症化のグルタミン酸トランスポーターの機能低下はグリア間コミュニケーションによって引き起こされる) SfN2011 (2011.11) (Washington D.C., USA; ワシントン D.C., アメリカ合衆国)

公開シンポジウム

1. 厚生労働省公開シンポジウム「ヒト iPS 細胞を用いた安全性薬理試験へのロードマップ」2012.2.25

G. 知的所有権の取得状況  
なし

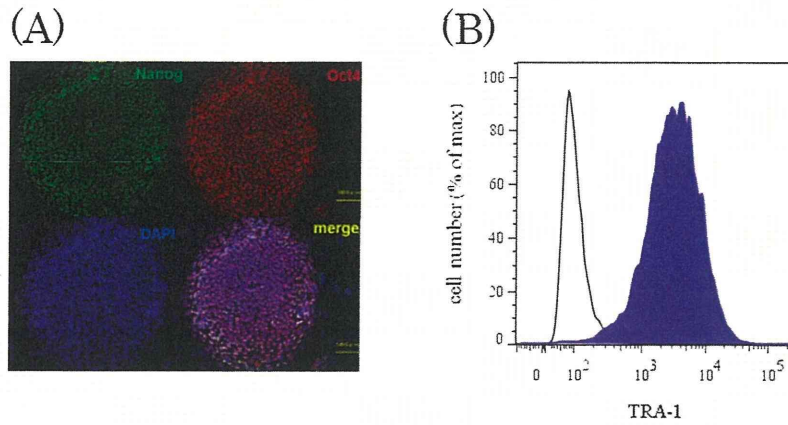


図1. ヒトiPS細胞における未分化マーカーの発現  
 (A)免疫蛍光染色によるNanogとOct3/4の発現。  
 (B) FACSによるTra-1-60の発現。

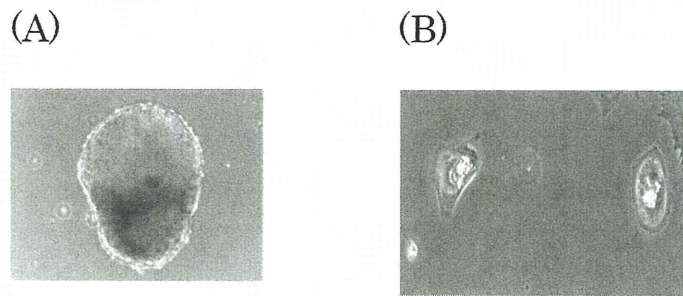


図2. ヒトiPS細胞から心筋への分化誘導  
 (A)形成させたEB。(B) EB由来の拍動する細胞。

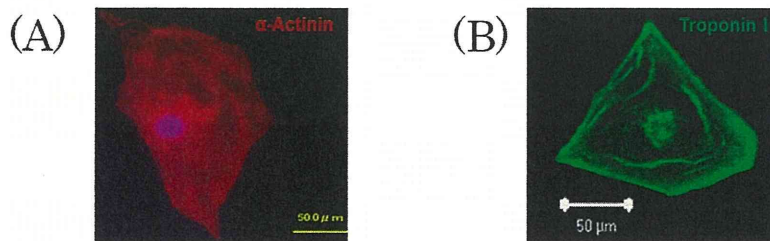


図3. 拍動細胞における心筋マーカーの発現。  
 (A)  $\alpha$ -Actinin (B) Troponin-I の発現を免疫蛍光染色により確認した。

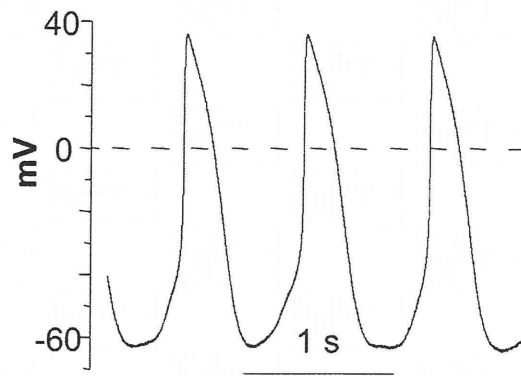


図4. 分化心筋細胞を用いた活動電位の測定

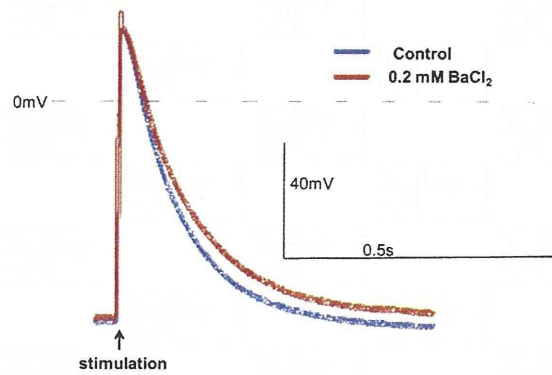


図5. 非拍動細胞におけるペーシングによる活動電位の発生。  
Ba存在下では活動電位時間の延長が認められた。

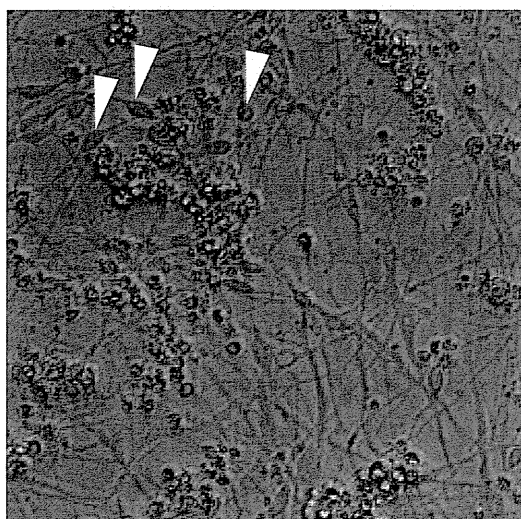
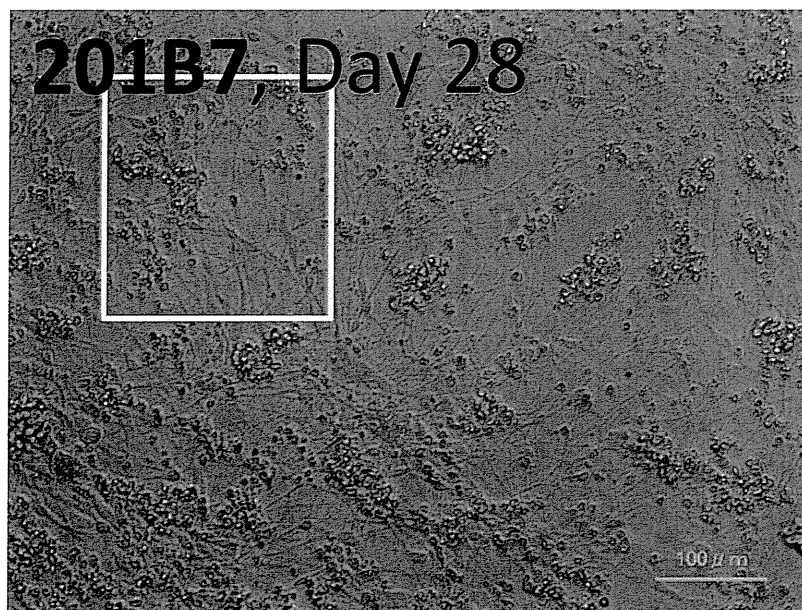


図 6. 201B7 由来神経細胞標本の分化誘導 28 日目の位相差顕微鏡像と拡大図  
分化誘導 28 日目において、神経細胞の特徴的な形態(細胞体, 長い突起等)をもつ  
細胞が確認できた(矢頭)。Bar = 100  $\mu\text{m}$

# 201B7

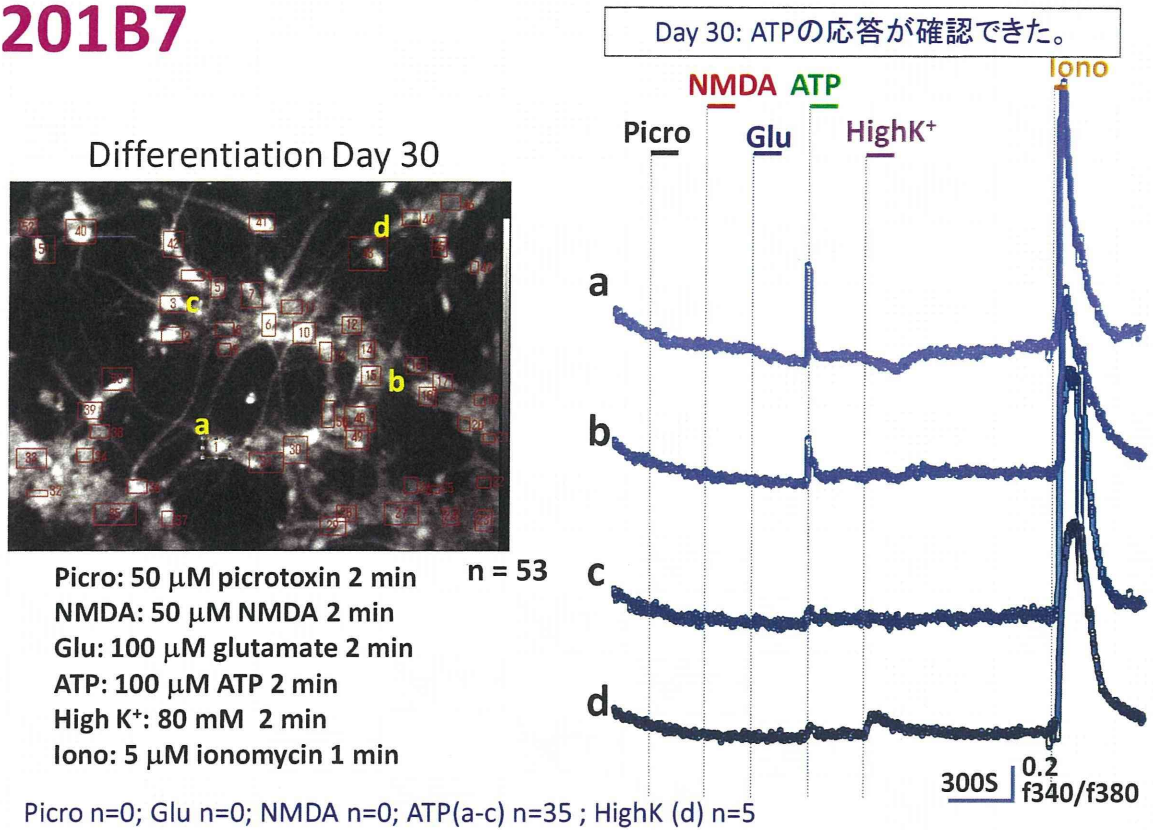


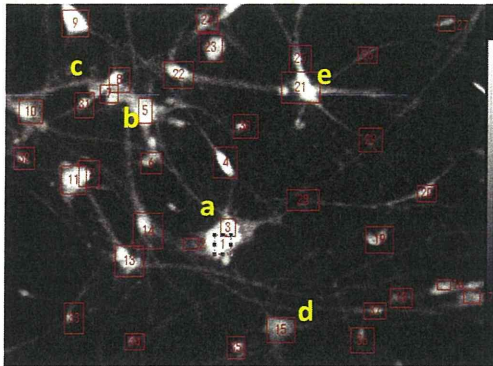
図 7. 201B7 由来神経細胞標本分化誘導 30 日目の各種リガンドに対するカルシウム応答

50  $\mu$ M picrotoxin 2 min、50  $\mu$ M NMDA 2 min、100  $\mu$ M L-Glu 2 min、100  $\mu$ M ATP 2 min、80 mM KCl 2 min の刺激を行った。ATP (35/53)、highK<sup>+</sup> (5/53) に対して反応を示した。



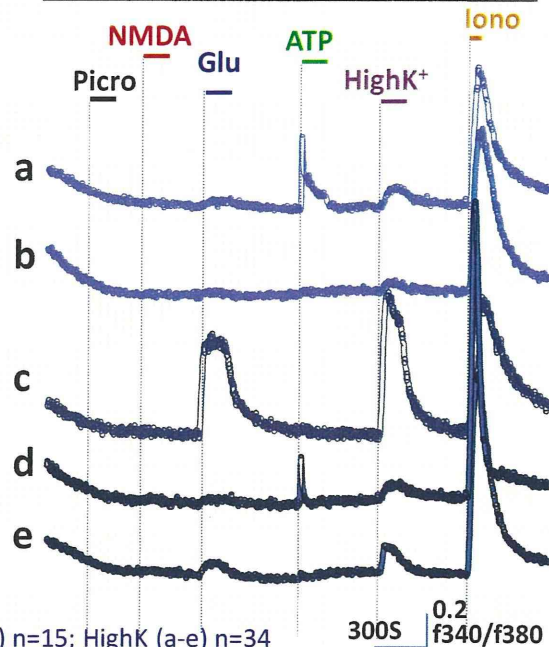
# 201B7

Differentiation Day 40



Picro: 50  $\mu$ M picrotoxin 2min      n = 37  
 NMDA: 50  $\mu$ M NMDA 2min  
 Glu: 100  $\mu$ M glutamate 2min  
 ATP: 100  $\mu$ M ATP 2min  
 High K<sup>+</sup>: 80 mM 2min  
 Iono: 5  $\mu$ M ionomycin 1min

Day 40: L-Glu, HighK<sup>+</sup> 刺激に反応する。  
 ATP刺激への反応はばらついている。  
 Picrotoxin に対しては反応しない。



Picro n=0; Glu(a,c,e) n=20; NMDA n=0; ATP(a, d) n=15; HighK (a-e) n=34

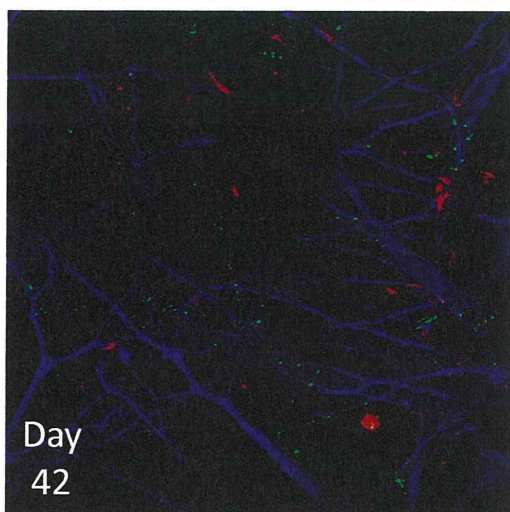
図 8. 201B7 由来神経細胞標本分化誘導 40 日目の各種リガンドに対するカルシウム応答

50  $\mu$ M picrotoxin 2 min、50  $\mu$ M NMDA 2 min、100  $\mu$ M L-Glu 2 min、100  $\mu$ M ATP 2 min、80 mM KCl 2 min の刺激を行った。L-Glu (20/37)、ATP (15/37)、highK<sup>+</sup> (34/37) に対して反応を示した。



# 201B7

MAP2/synapsin1/PSD95



Day  
42

20 μm

図 9. 201B7 由来神経細胞標本の分化誘導 40 日目における synapsin1 および PSD95 の発現

緑:synapsin1、赤:PSD95、青:MAP2。PSD95 の発現は非常に低く、ごく稀にドットが検出された。synapsin1 は極小のドット状の分布を示したが、PSD95 との共局在は観察されなかった。Bar =100 μm

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
川西徹	医薬品の品質を巡る話題 ー化学合成医薬品に関わる レギュラトリーサイエンス ー	レギュラトリーサイエンス誌	2	67-73	2012
Sakai-Kato K, Nanjo K, Kawanishi T, Okuda H	Rapid and sensitive method for measuring the plasma concentration of doxorubicin and its metabolites	<i>Chem Pharm Bull.</i>	60	391-396	2012
Sakai-Kato,K., Ishikura, K., Oshima, Y., Tada, M., Suzuki, T., Ishii-Watabe, A., Yamaguchi, T., Nishiyama, N., Kataoka, K., Kawanishi,T., Okuda H.	Evaluation of intracellular trafficking and clearance from HeLa cells of doxorubicin-bound block copolymers,	Int J Pharm	423	401-409	2012
加藤くみ子	“DDS製剤評価の動向と今後の課題	HUMAN SCIENCE	23	28-31	2012
Kurose K, Hiratsuka K, Ishiwata K, Nishikawa J, Nonen S, Azuma J, Kato M, Wakeno M, Okugawa G, Kinoshita T, Kurosawa T, Hasegawa R, Saito Y.	Genome-wide association study of SSRI/SNRI-induced sexual dysfunction in a Japanese cohort with major depression.	<i>Psychiatry Res.</i>			In press
Maekawa K, Nishikawa J, Kaniwa N, Sugiyama E, Koizumi T, Kurose K, Tohkin M, Saito Y.	Development of a rapid and inexpensive assay for detecting a surrogate genetic polymorphism of HLA-B*58:01: a partially predictive but useful biomarker for allopurinol-related Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis in Japanese.	<i>Drug Metab Pharmacokinetics.</i>			
有田誠、斎藤嘉朗、田口良、西島正弘	メタボローム新技術が切り拓くこれからの脂質バイオロジー研究	実験医学	30	446-454	2012

Sato, K., Kuriwaki, J., Takahashi, K., Saito, Y., Oka, J., Otani, Y., Sha, Y., Nakazawa, K., Sekino, Y., Ohwada, T.	Discovery of a tamoxifen-related compound that suppresses glial L-glutamate transport activity without interaction with estrogen receptors.	ACS Chem Neurosci	3	105-113	2011
Morizawa, Y., Sato, K., Takaki, J., Kawasaki, A., Shibata, K., Suzuki, T., Ohta, S., Koizumi, S.	Cell-autonomous enhancement of glutamate uptake by female astrocytes.	Cell Mol Neurobiol			2012
Takata, F., Dohgu, S., Yamauchi, A., Matsumoto, J., Machida, T., Fujishita, K., Shibata, K., Shinozaki, Y., Sato, K., Kataoka, Y., Koizumi, S.,	In vitro blood-brain barrier models using brain capillary endothelial cells isolated from infant and adult rats retain age-related barrier properties.	Plos ONE			In press

シリーズ (医薬品評価をめぐる最近の話題)

## 医薬品の品質を巡る話題 —化学合成医薬品に係わるレギュラトリーサイエンス—

### Recent Topics of Regulatory Science in the Quality Area of Chemical Drugs

川西 徹

Toru KAWANISHI

#### Abstract

Recent three topics in the quality area of chemical drugs are introduced as issues which should be addressed in regulatory science. First, health hazards by adulterated drugs have occurred under internationalization of drug production including supply of raw materials and drug distribution. To prevent the hazard, exhaustive impurity test using LC-MS may be useful when raw materials are selected. Second, application of science-based and risk-based modern quality management techniques to pharmaceutical production and quality assurance was proposed and the ICH guidelines for the application have been harmonized. For the implementation, the development and establishment of Process Analytical Technology by co-operation among industry, government and academia group are needed. Third, importance of regulatory science in development of innovative drugs is pointed out by the Council for Science and Technology Policy in the Cabinet Office. The point-to consider about quality aspects in the development of peptide drugs and nucleotide drugs should be made, because there is no consensus open.

#### 抄 録

化学合成医薬品の品質分野において、レギュラトリーサイエンスとしての研究や議論が必要と思われる三つの話題をとりあげた。第一は医薬品製造・流通の国際化を背景に発生した、有害物質によって異図的に汚染された医薬品による健康被害である。医薬品製造原料を選択する際に、液体クロマト質量分析法によって網羅的に不純物を試験すれば、このような健康被害を未然に防ぐことができよう。第二は科学的かつリスク分析に基づいた開発手法を医薬品製造および品質管理に応用しようという提案がされ、この考えに基づいたICH品質ガイドラインの国際調和が進んでいることである。この手法を実現、普及させるには、産官学共同でプロセス解析法の開発および確立を図る必要がある。第三は総合科学技術会議によって指摘されたように、先端的医薬品開発におけるレギュラトリーサイエンスの役割の重要性である。主たる対象は再生医療製品等であるものの、化学合成医薬品類でも、ペプチド性医薬品や核酸医薬品等では、開発にあたって品質面について考慮すべき要件をまとめることは、これら医薬品の開発促進に結びつくと思われる。

**Key words:** quality, adulteration, QbD, peptide drug, DNA drug

## 1. はじめに

医薬品・医療機器を主なスコープとしたレギュラトリーサイエンス学会が設立され、活発な活動が開始された。医薬品のレギュラトリーサイエンスにかかわる産官学の意見交換の場としては、医薬品品質分野においては国内で既に医薬品品質フォーラム<sup>1)</sup>、バイオロジクスフォーラム<sup>2)</sup>、あるいは日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会<sup>3)</sup>等の活動が行われており、既に8年が経過している。本稿ではこれらの活動経験をもとに、特に化学合成医薬品の品質を対象としたレギュラトリーサイエンス関連の最近のトピック、およびその課題を、オムニバスとしてまとめる。

## 2. 医薬品の品質とは

レギュラトリーサイエンス学会は広く医薬品の規制に係わる評価を対象とした学会であるが、学会員の皆様には、医薬品の「品質」に馴染みが薄い方もおられると思われる。そこで蛇足となるかもしれないが、「医薬品の品質とは何か？」から本稿を始めたい。

医薬品の評価の三つの要素として、有効性、安全性、品質という表現がしばしば使われる。この中で、有効性は「医薬品の効きめ」、安全性は「医薬品の有害（望まれない）作用」と表現できる。一方「医薬品の品質」はどのように表現できるか？工業製品の「品質」といえば、一般には「提供される製品やサービスについて、買い手側である顧客（消費者）が求める特性との合致度（合致度が高ければ品質が高いといわれる）（2011年10月29日ウィキペディア）」というように受け取られているものと思われる。この理解では、有効性、安全性も品質に含まれることとなり、また一般の方々には、「医薬品の品質」といえば、有効性や安全性をも含む概念と受け取られている方が多いと思われる。しかし、医薬品の規制においては、「医薬品の品質」という言葉はより限定された意味で使われている。即ち「物質としての医

薬品」である。

我が国では新有効成分医薬品を市販しようとする場合、申請者は規制当局に製造販売承認申請を行って審査をうける。その際、通常以下のような内容からなる申請資料およびデータを提出する。

- ① 医薬品の開発の経過（起源又は発見の経緯及び外国における使用状況）
- ② 物質としての医薬品（製造方法、物理的・化学的性質並びに規格及び試験方法等に関する資料）
- ③ 医薬品の安定性（安定性に関する資料）、
- ④ 医薬品の作用（動物や細胞等への薬理作用に関する資料）
- ⑤ 医薬品の毒性（非臨床試験での安全性に関する資料）
- ⑥ 医薬品の体内動態（吸収分布代謝排泄に関する資料）
- ⑦ 医薬品の有効性・安全性（臨床試験における治療効果、有害作用に関する資料）
- ⑧ その他

以上の中で、「品質」は②と③である。この中味をさらに分けると以下のようにまとめられる

- (ア) 医薬品の製造方法（医薬品原料および製造工程の管理方法を含む）
- (イ) 医薬品の構造および理化学的特性（タンパク質性医薬品のような生物医薬品の場合は生物学的特性も含む）
- (ウ) 医薬品の規格および試験法（医薬品が一定であることを確認するための試験セットおよび判定基準）
- (エ) 医薬品の安定性（医薬品が安定であることの確認 → 規格および保存条件の設定）

このような医薬品の「品質」部分を、米国食品医薬品庁FDAでは“CMC”と称するが、これは“Chemistry, Manufacture, Control（化学、製造、管理）”の略である。

では「医薬品の品質」の重要性は何か？新薬の場合、承認申請時では上記のように、非臨床試験による薬理試験、安全性（毒性）データ、臨床

試験による有効性、安全性を示すデータを提出、審査を受け承認される。しかし、実際の医薬品には有効成分以外に不純物が含まれるが、製造企業が異なれば通常は製造方法に違いがあり、有効成分は同一でも含まれる不純物は異なる。さらに、ヒトに投与するにあたっては、有効成分は製剤化され、医薬品製剤として投与される。例えば、経口固形製剤では消化管で有効成分が溶出し、血液中に吸収され、作用部位に到達して作用を発現する。溶出率や溶出速度が異なれば作用も異なる。したがって、同じ有効成分からなる医薬品でも、製造メーカーが異なると有効性、安全性も異なる可能性があり、また同じメーカーでも製造方法が変動すると、製造ロット間で有効性、安全性が変わることがある。しかし、一度承認された医薬品は、製造方法に大きな変更がある場合を除いて、非臨床試験、あるいは臨床試験による有効性、安全性試験を繰り返すことはなく（新薬は承認後の再審査期間中、市販後調査を課せられるが、これは厳重な比較試験ではない）、医薬品の一定性は品質面での管理（製造原料、製造工程の管理、および製品規格試験からなる）によって担保される。したがって、医薬品の製造方法、および品質管理は、医薬品の有効性、安全性を保証するように設定されている必要があり、品質部分は申請者と規制当局との約定ともいえる承認事項をまとめた文書である製造販売承認申請書の中核をなす。

このように医薬品の「品質」は、物質としての医薬品を対象としたものであるが、その目的は医薬品の有効性、安全性の確保にあるといえる。

### 3. 医薬品の製造・流通の国際化への対応

#### 3-1. 医薬品原料への異図的な有害物質混入事件

現在我々の身の回りを見渡すと国際化の波は著しいものがある。身の回りの品々の生産地をみると、東アジア、東南アジア、西アジア、南米、中米、東欧を含めて様々である。医薬品の場合、服装品や電化製品ほどではないが、様々な国々で製造された製品が流通するようになっている。さら

に製造原料の供給国をたどるとその範囲は一段と広がり、供給先を突き止めることが困難ともいえる状況になりつつある。

このような医薬品の製造・流通の国際化の中、ここ数年でヒトの健康に直接係わる医薬品にとって由々しき事件が発生している。その一つは医薬品添加物グリセリンへのジエチレングリコール DEG の異図的な混入による健康被害である。最も有名な事件として、中国で製造された工業用 DEG にグリセリンのラベルが貼られ、スペインの商社をへてパナマに輸入され、これを原料として製造されたシロップ風邪薬によって、多数の小児が死亡したことが国際的に報道された<sup>4)</sup>。DEG 混入は最近では日本で報道されることは少ないが、同様な事件は今でも西アジアやアフリカで繰り返し起こっている。続いて国際的に有名な事件は、抗凝固ヘパリン製剤の原料ヘパリンへの過硫酸化コンドロイチン硫酸 OSCS の異図的な混入事件である。これも中国産ヘパリン原料への混入が原因であることが明らかとなっているが、米国を中心にアレルギー反応によって多数の健康被害が生じた<sup>5)</sup>。医薬品の国際的流通が欧米ほど活発ではない日本では、幸いにも健康被害事件とはなっていないものの、日本でも OSCS が混入したヘパリン原料が見つかった。このように悪質な有害物質混入原料が、国際的な流通ルートの中で巡り巡って、地球の裏側で健康被害を起こすという事件が立て続けに起こり、米国 FDA や欧州医薬品規制当局、あるいは WHO 等は警戒を強めている。特に FDA は医薬品原料へのエチレングリコール、メラミン混入等にも注意を向けている。

#### 3-2. 異図的な混入物質に対するレギュラトリーサイエンスの対応

現在、このような健康被害を未然に防ぐためには、どのような医薬品品質管理体制を敷くべきか、議論が行われている。米国 FDA や欧州議会には、緊急な措置としてそれぞれの域の薬局方に対応を求め、その結果、日本薬局方を含め、各域の



薬局方は純度試験等で当該異図的不純物の混入を否定する等の対応をとった。しかし、この種の混入物質に対する総合的な対策として、有機化合物医薬品原料の不純物について、網羅的な解析が可能な標準的な分離分析法の設定が重要なテーマになると思われる。分析法としては液体クロマトグラフ質量分析法 LC-MS が試験法としての網羅性、選択性という点からもっとも適していると思われる。新たに医薬品原料を調達する際は、標準的ないくつかの移動相セットで LC-MS 分析することによって、異図的な有害混入物質の混入の可能性を否定するステップを踏むことが方策としては適切と著者は考える。その際、医薬品原料群ごとの妥当な試験条件、および判定基準の設定が、レギュラトリーサイエンスの課題になると思われる。

#### 4. 医薬品の製法開発・品質管理手法の新しい潮流とその対応

##### 4-1. 医薬品製法開発・品質管理の新しい手法<sup>6)</sup>とは

医薬品の品質分野では、Quality by Design (QbD) アプローチという言葉に象徴される新しい医薬品製法開発・品質管理戦略が欧米から提案され、ICH（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）においても、一大テーマとなっている。この潮流が生まれた背景は以下の通りである。

医薬品はヒトの体内に投与され健康に直接関わる製品であるため、極めて厳しい規制が行われてきた。また一度開発、承認されても、品質の向上あるいは製造コストの改善等を目指した製法変更にあたっては、規制当局による承認あるいは届出が課せられ、変更の実施までに時間、経費がかかる。そのため製造工程の変更を避ける傾向があり、工業製品の中でも製造・品質管理は古いままであることが少なくないといわれている。一方規制側からみると、承認申請の審査ばかりでなく、製法変更に関する承認審査、さらに GMP 査察等のために大きなリソースが必要とされ、規制コストの増大を招いているといわれている。そこで、

医薬品製法開発・品質管理に新しい製造科学とリスク分析の考えを導入し、製造・品質管理を近代化しようというわけである。

この新しいアプローチでは、

- ① 医薬品製剤を開発するにあたって、製剤設計を科学的に行うと同時に各種リスク分析手法を活用し、有効性、安全性に影響する製剤の品質特性パラメータを明らかにし、その許容範囲を明確にする
- ② 製造工程において、製剤の品質特性パラメータに影響しうる原料特性及び製造工程パラメータを特定し、品質特性パラメータと原料特性及び製造工程パラメータとの機能的関係を特定する
- ③ 以上の情報、知識をもとに医薬品製剤の適切な管理戦略を構築するという過程を踏むとされる。

この管理戦略では、最終製品の品質試験ではなく、製造工程パラメータ管理、およびプロセス解析工学 (PAT) を活用した製造工程中の試験またはリアルタイムリリース試験による管理を目指す。その際、上記②の段階で得られた情報・知識を利用して、管理値を柔軟なものとする (= デザインスペース) とともに、製品を生産する間に得られる知識を加味して、製品ライフサイクルにわたって改善を図る。また製造工程管理が柔軟なものになった結果、規制当局の承認が必要な製法変更の機会は減り、規制コストの削減に結びつく。

##### 4-2. QbD 的アプローチを普及させる上でのレギュラトリーサイエンスの課題

このような科学的アプローチ (= QbD アプローチ) による医薬品製法開発および品質管理手法の実現を促進する上でのレギュラトリーサイエンスの課題としては、以下のようなものが考えられる。

- (1) 重要品質特性の特定、および有効性・安全性に悪影響を及ぼさない重要品質特性の変動範囲を求めるための手法の開発、さらに関連す

### る情報・知識の蓄積

製造管理に柔軟性をもたらすデザインスペースを設定するためには、重要品質特性を特定するとともに、有効性・安全性に悪影響を及ぼすことのない重要品質特性パラメータの許容幅を求める必要があるが、製品の特性上これを達成することが困難な製品群があり、QbD的手法の適用は制約される。例えば、タンパク質性バイオ医薬品の多くは、目的物質の分子多様性や、不純物のヒトにおける安全性予測の困難さ等による制約がある<sup>6)</sup>。また、小分子化学合成医薬品でも製剤に標的性を付与したDDS製剤の場合などは困難が予想される。即ち、有効性・安全性に関わる体内動態として、血中濃度を指標としたバイオアベイラビリティの評価のみでは十分ではなく、標的部位への分布を含めた生体内分布情報と品質特性との関係、および生体内分布と有効性と安全性との関係の情報が必要となる。したがって、これら製剤の場合デザインスペースの設定には困難が伴うことが予想される。

このようなバイオ医薬品やDDS製剤等における問題を克服するためには、バイオ医薬品では構造解析手法の更なる革新とともに、構造あるいは理化学的特性と生物作用の関係に関する情報の蓄積という、地道な技術的科学的情報の蓄積が必要となる。またDDS製剤のような機能性製剤においては、製剤機能に関わる製剤の理化学的特性の特定が重要であり、これらの情報の蓄積により、現状の高いハードルがやがて解消されてゆくことが期待される。

### (2) 製造工程リアルタイムモニタリング手法の開発および確立

科学的アプローチを採用する効用の第一として、最終製品の出荷試験による製造管理から、工程パラメータ管理およびリアルタイムモニタリング手法を活用した製造管理を重視した、医薬品製造管理の高度化にあると考える。リアルタイムモニタリングにより製造工程中の製品の品質特性を

確認し、その結果を工程管理に反映させながら製造工程を制御することが可能になれば、高品質の製品の高効率な生産が実現し、さらにリアルタイムリリースの実現に結びつく。このような製造管理の革新を実現する上でキーとなる技術は、製造工程のリアルタイムモニタリング手法であり、今後医薬品製造管理に関わる分析技術として注力すべきポイントはこれらの手法の開発にあると考える。その例としてはイメージング手法を含めた近赤外分析法、有効成分や不純物を高速かつ定量的にモニタリングする技術として、超高压液体クロマトグラフィー(UHPLC)等があげられる

### (3) 新しい手法に関する、申請側と規制側との理解の一致

上記(1)、(2)に記したような情報・知識の蓄積、あるいは技術開発においては、製造側と規制側とが理解を一致させながら進捗させることが望ましい。その意味から、レギュラトリーサイエンスの課題とするに相応しい問題と考える。

## 5. 先端的医薬品の開発とレギュラトリーサイエンス

総合科学技術会議における第4期科学技術基本計画<sup>7)</sup>、あるいは医療イノベーション推進室の文書<sup>8)</sup>等の中で、我が国において先端的医薬品・医療機器開発を促進する上でのレギュラトリーサイエンスの充実・強化が最重要課題としてあげられている。これらライフイノベーションあるいは医療イノベーションが対象とする先端的医薬品としては、細胞組織加工医薬品・医療機器等のバイオテクノロジー応用製品が中心になると思われるが、核酸医薬品やペプチド性医薬品、あるいは先端的製剤技術を利用したナノ医薬品やDDS製剤などもその対象になろう。そこで、これら通常の化学合成医薬品製剤とバイオテクノロジー応用製品との中間に位置するような医薬品の品質面の課題について考察する。

我が国において新有効成分医薬品の承認申請に

において参照すべき規制文書としては、ICH 品質ガイドラインが第一にあげられる。このうち化学合成医薬品については、ICH-Q6A が規格および試験法の設定、ICH-Q3シリーズが不純物（残留溶媒を含む）評価、ICH-Q1シリーズが安定性評価、ICH-Q4B が主要な品質一般試験法、ICH-Q2 が分析法バリデーションを扱い、原薬 GMP を扱った ICH-Q7 を含めて、開発時あるいは承認申請に当たって必要な品質面の要件の基準が示されている。これら化学合成医薬品品質ガイダンスの適用対象をみると、ICH-Q6A では小分子量化学合成ペプチドは適用可能とされているが、高分子量のペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチドは適用対象から外されている。またペプチド、オリゴヌクレオチドは ICH-Q3 シリーズの適用対象から外されている。このことは、これらペプチド性医薬品あるいは核酸医薬の多くは、化学合成で製造されるものが多いとはいえ、既に準備されている化学合成医薬品ガイドラインとは別途の配慮が必要とみなされていることの反映である。一方これらの医薬品の有効成分は比較的分子量が大きく、物質的にも生体成分と共通しており、タンパク質性医薬品を中心とした生物製品のガイドラインをベースにするという考えもあるかもしれない。しかし、生物製品の品質ガイドラインである ICH-Q5 シリーズおよび ICH-Q6B でも、合成ペプチド及びポリペプチドや DNA を成分とする医薬品は適用対象から外されている。

このように化学合成された分子量が比較的大きいペプチド性医薬品、あるいは核酸医薬品を適用対象とした品質面での規制ガイドラインはなく、規制に当たっては個別の製品ごとの判断にゆだねられている状況にある。特に核酸医薬品については承認された製品はまだ少なく、世界を見渡しても品質評価にあたっての基本的要件をまとめた文書はみあたらない。したがって、これら先端的医薬品の開発環境を整備するという意味からも、レギュラトリーサイエンスの課題として取り上げる意義は大きい。即ちこれらの医薬品の開発経験者

と規制関係者が開発段階から情報交換を行い、開発に際して考慮が必要な要件を随時まとめておくことは、これら医薬品の臨床応用を早期に実現する上でも大きな推進力となる。

ペプチド性医薬品の品質評価は、①有効成分の生物作用がアミノ酸一次構造で一義的に決定されるのか、あるいはタンパク質性医薬品と同様に生物作用が異なるような複数の高次構造を持ちうるのか、②生体内で特別な生物作用を発現するような構造の有無、③有効成分および不純物の生物作用の種特異性の有無、および動物を用いた非臨床試験のヒト作用の予測性の有無、④免疫原性の有無、等の特性の違いによって、整理されると思われる。

一方核酸医薬品（＝オリゴヌクレオチド医薬品）の品質評価においては、アンチセンス、リボザイム、デコイ、siRNA、アプタマー等、その作用メカニズムに応じた配慮が品質評価においても必要になると思われる。またアプタマーなど高い標的特異性をもたせた医薬品については、ヒト型タンパク質性医薬品同様にヒト細胞系を用いた生物学的特性解析が品質評価においても重要になるかもしれない。また核酸医薬品の多くは、臨床応用に際しては DDS 製剤化が必要となり、DDS 製剤としての品質評価も必要となる。

以上、ペプチド性医薬品と核酸医薬品の品質評価について、筆者が要点と考えている点について触れた。これらに加えて、先端的医薬品の品質評価の重要な視点としては、ヒト初回臨床試験に先立って確認しておくべき品質特性の整理が重要であり、レギュラトリーサイエンスの格好のテーマになると思われる。視点としては、①ヒト試験の安全性確保に関わる品質特性は何か、②ヒト初回臨床試験以降、承認申請に至るまでの開発過程の中で一定性の確保を図るべき品質特性は何か、の二つがあげられる。

## 6. おわりに

以上、化学合成医薬品を中心に、医薬品品質分野のレギュラトリーサイエンスにおける課題例をあげ、考察を加えた。本稿にあげた課題例は筆者が個人的見解として選択したものであり、これら以外にも様々な課題がある。今後これらの課題についてレギュラトリーサイエンス学会において産官学で意見交換、情報交換が行われ、医薬品の適切な規制に結びつく成果が生まれることを期待する。

## 文 献

- 1) <http://www.nihs.go.jp/drug/PhForum/>
- 2) [http://www.nihs.go.jp/dbcb/Biologics\\_forum/bioforum-9.html](http://www.nihs.go.jp/dbcb/Biologics_forum/bioforum-9.html)
- 3) <http://www.nihs.go.jp/doc/rs/index.html>
- 4) McLean R, McDonald B, The New York Times, 2007年5月6日
- 5) Kishimoto TK, et al., N Engl J Med. 2008; 358: 2457-2467
- 6) 川西 徹. 製剤機械技術ハンドブック第2版. 製剤機械技術研究会編. 2010; 943-949.
- 7) 科学技術基本計画. 平成23年8月23日閣議決定.
- 8) 医療イノベーションの進め方. 平成23年10月内閣官房医療イノベーション推進室.

## Rapid and Sensitive Method for Measuring the Plasma Concentration of Doxorubicin and Its Metabolites

Kumiko Sakai-Kato,\*<sup>a</sup> Kunie Nanjo,<sup>a</sup> Toru Kawanishi,<sup>b</sup> and Haruhiro Okuda<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Division of Drugs, National Institute of Health Sciences; and <sup>b</sup>National Institute of Health Sciences; 1–18–1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158–8501, Japan.

Received September 9, 2011; accepted December 16, 2011; published online December 21, 2011

**Doxorubicin is an anti-cancer drug with a wide therapeutic range. However, it and its metabolites cause severe side effects, limiting its clinical use. Therefore, measuring the plasma concentration of doxorubicin and its metabolites is important to study the dosing regimen of doxorubicin. We developed a rapid and sensitive method by ultra-high-performance liquid chromatography with fluorescent detection for measuring the plasma concentration of doxorubicin and its metabolites in small volumes (around 10  $\mu$ L), enabling repeated measurements from the same mouse. The sensitivity of 7-deoxydoxorubicinolone, a major metabolite of doxorubicin, increased about 5 times than those ever reported using conventional HPLC, and the run time was within 3 min. The area under the curve ( $AUC_{0-24h}$ ) of doxorubicin was 5.9  $\mu$ g h/mL similar to the value of 4.16  $\mu$ g h/mL obtained previously using a conventional HPLC method. This method would provide information that could be used to refine the therapeutic approach to doxorubicin use.**

**Key words** doxorubicin; metabolite; pharmacokinetics

The anthracycline doxorubicin is one of the most widely used anticancer agents, and it has a broad spectrum of activity against a variety of malignancies.<sup>1,2</sup> New formulation technologies to enhance the effectiveness and safety of this anticancer drug are currently being developed. For instance, long-circulating and sterically stabilized liposomes containing doxorubicin can markedly increase tumor-specific deposition of drugs and have been approved as clinical products.<sup>3</sup> However, the clinical use of doxorubicin is limited by the side effect of cumulative, dose-dependent, irreversible chronic cardiomyopathy caused by doxorubicin itself and its metabolites, and optimal dose schedules remain a matter of debate.<sup>4</sup> Therefore, measuring the plasma concentration of doxorubicin and its metabolites is important to study the dosing regimen of doxorubicin.

Mice are very useful small laboratory animals for nonclinical research and are often used for pharmacokinetic, pharmacological, or drug formulation studies of doxorubicin.<sup>5–7</sup> Blood collection from the tail vein is becoming popular from the perspective of animal protection, but it has the limitation of small sample volumes. Therefore, it is often difficult to perform repeat investigations in the same animal to assess time-dependent changes in plasma concentrations, and many mice have to be killed for whole blood collection at each time point.

In a previous study, we succeeded in developing a method for measuring intracellular concentrations of doxorubicin and its metabolites by using ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC).<sup>8</sup> The resolution, sensitivity, and speed of analysis dramatically increased with the use of 2- $\mu$ m particles in the stationary phase, high linear velocities for the mobile phase, and instrumentation that operates at higher pressures than those used in HPLC.<sup>9–11</sup> Specifically, the quantitation limit of doxorubicin was about 2 times lower than the limit ever reported using conventional HPLC, and run time was shorten from 20 min to within 3 min.<sup>12,13</sup> Because of the high sensitivity of our method and the small sample volumes (around 10  $\mu$ L) required, in the current study we were able to measure changes in the concentration of doxorubicin and its metabolites over time in a single mouse, thereby diminish-

ing the number of animals needed. This method would also have clinical utility, because the reduction of sample volumes and analytical times would decrease the burden of therapeutic drug monitoring (TDM) for patients.

### Experimental

**Drugs and Chemicals** Doxorubicin hydrochloride, daunorubicin hydrochloride, and verapamil were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). Doxorubicinol hydrochloride, and 7-deoxydoxorubicinolone were purchased from Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Canada). Doxorubicinolone was synthesized from doxorubicinol by acidic hydrolysis (0.5N HCl) at 50°C for 24 h, and then extracted with chloroform by a liquid–liquid extraction method.<sup>14</sup> Stock solution of each chemical was prepared by weighing separately. The primary stock solution of each chemical was prepared in methanol at 0.35 or 0.1 mg/mL and stored at –80°C. The standard solutions for validation data were obtained by mixing each chemical with mouse blank plasma.

**Preparation of Mouse Plasma Samples for HPLC** Doxorubicin was administered at 10 mg/kg by tail vein injection into female Balb/c mice purchased from CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan). Blood was collected from the tail vein into heparinized capillaries 10, 20, 40, and 60 min and 2, 6, and 24 h after doxorubicin administration. Plasma obtained from the blood sample (about 10  $\mu$ L) was mixed with saline, 50% methanol, and ZnSO<sub>4</sub> (final concentration: 400 mg/mL) and centrifuged at 15000 *g* for 10 min in a microcentrifuge (Model 3740, Kubota Corp., Tokyo, Japan); the supernatants were then collected. Plasma and saline volumes were adjusted so that the concentration of each compound was within the calibration curve range. A 15- $\mu$ L aliquot of each supernatant was mixed with 5  $\mu$ L of the internal standard (daunorubicin, 10  $\mu$ g/mL in methanol), 22.5  $\mu$ L ice-cold methanol, and 7.5  $\mu$ L Milli-Q water, and filtered through a 0.20- $\mu$ m filter (Millex-LG, Millipore Corp., Tokyo, Japan). The filtrates were transferred to autosampler vials before UHPLC analysis. All experimental procedures were approved by the institutional

\* To whom correspondence should be addressed. e-mail: kumikato@nihs.go.jp

animal care and use committee.

**HPLC Conditions** High-throughput quantification of doxorubicin and its metabolites was performed in a Hitachi LaChrom ULTRA system equipped with an L-2160U pump, an L-2200U automated sample injector, an L-2300 thermostated column compartment, and an L-2485U fluorescence detector (Hitachi, Tokyo, Japan).<sup>8)</sup>

Samples were analyzed on a Capcell Pak C18 IF column (2.0×50 mm; particle size, 2 μm; Shiseido Corp., Tokyo, Japan). The mobile phase consisted of a mixture of 50 mM sodium phosphate buffer (pH 2.0) and acetonitrile (65:27, v/v). The mobile phase was delivered at a rate of 300 μL/min, and

the column temperature was maintained at 25°C. The fluorescence detector was operated at an excitation wavelength of 470 nm and an emission wavelength of 590 nm.

**Pharmacokinetics Analysis** Pharmacokinetics were analyzed by noncompartmental analysis using Phoenix WinNonlin V6.1 software (Pharsight Corporation, CA, U.S.A.).

### Results and Discussion

Doxorubicin is mainly metabolized in liver, and the estimated metabolic pathway was shown in Fig. 1a. According to a report where human metabolism of doxorubicin was studied

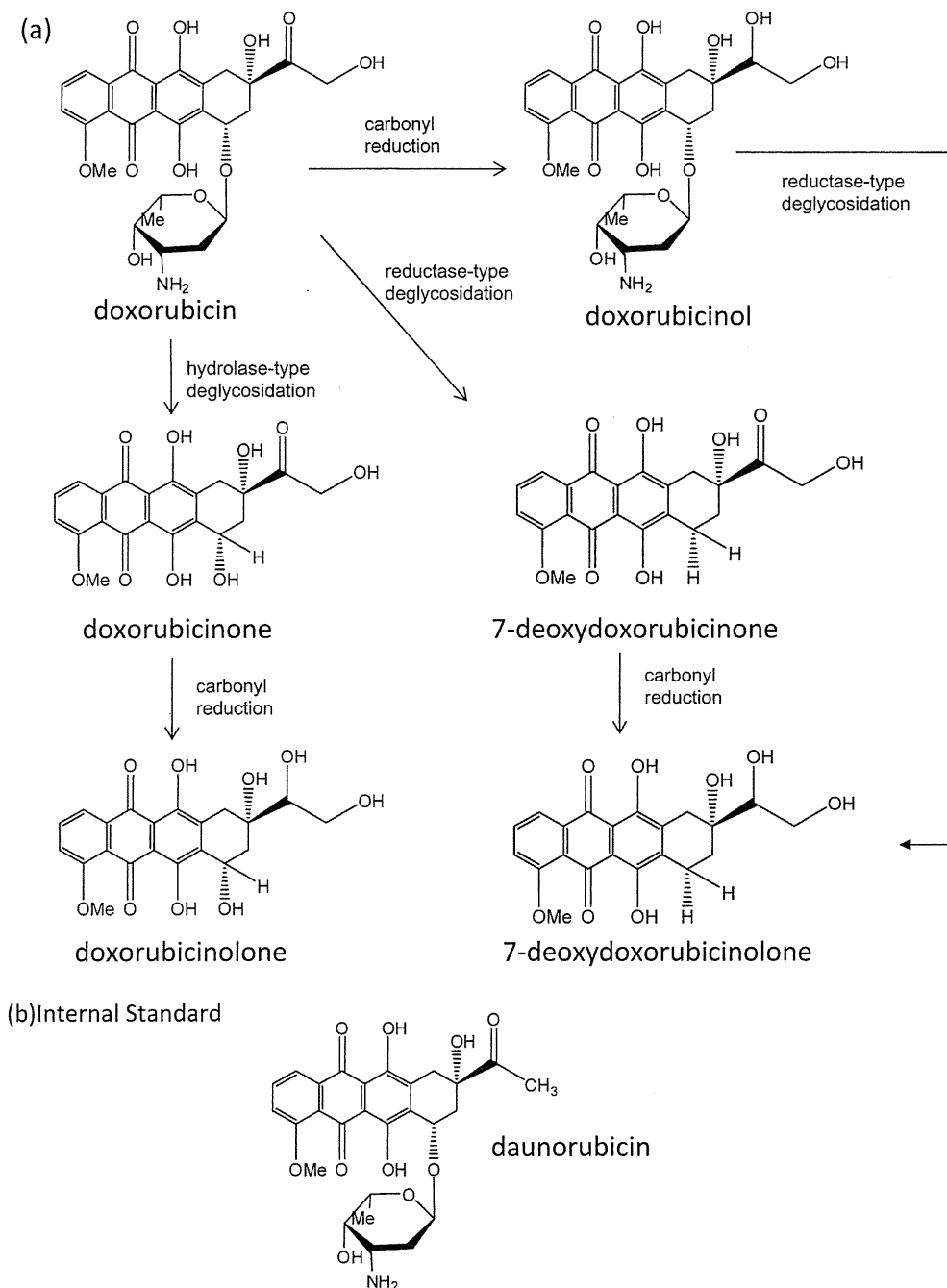


Fig. 1. Schematic Showing the Chemical Structures of Doxorubicin and Its Metabolites (a) and the Chemical Structure of Daunorubicin, the Internal Standard (b)